



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.152.314'14

### НОВАЯ СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗА ИЗ *ESCHERICHIA COLI* RFL 72

Казлаускаене Р., Манялене З., Буткус В.,  
Пятрушките М., Янулайтис А.

Научно-производственное объединение «Фермент», Вильнюс

*E. coli* — один из первых видов микроорганизмов, в которых были открыты рестриктазы II класса [1]. Однако, если судить по литературным данным, поиску специфических эндонуклеаз в штаммах *E. coli* долгое время не уделялось серьезного внимания. Лишь сравнительно недавно появились сообщения об открытии рестриктаз *EcoRV* [2], *EcoCK* [3, 4], *EcoVIII* [5]. Проведенные нами исследования свидетельствуют о том, что *E. coli* является богатым источником рестриктаз, различающихся субстратной специфичностью [6—9]. В настоящей работе приводятся данные о субстратной специфичности еще одной новой рестриктазы, выделенной из *E. coli* RFL72.

По данным электрофоретического анализа, исследуемая рестриктаза *Eco72I* расщепляет ДНК фага  $\lambda$  в трех местах и не имеет ни одного участка узнавания в ДНК рРВ322, фХ174, fd и SV40. Сравнение этих результатов с табличными [10] и машинными данными (представлены А. А. Мироновым) о частоте встречаемости различных последовательностей в ДНК фага  $\lambda$  показало, что только две нуклеотидные последовательности дают такую частоту фрагментирования вышеуказанных субстратов: dCCCGGG, представляющую собой участок узнавания рестриктазы *SmaI*, и dCACGTG, для которой фермент не был известен. Визуальное сравнение электрофореграмм продуктов гидролиза ДНК фага  $\lambda$  рестриктазами *Eco72I* и *SmaI* убедило нас в разном характере их субстратной специфичности. Число и размеры *Eco72I*-фрагментов ДНК фага  $\lambda$ , а также фрагментов, образующихся в результате гидролиза этой ДНК комбинациями рестриктаз *Eco72I* + *SmaI*, *Eco72I* + *BamHI*, *Eco72I* + *HindIII*, *Eco72I* + *SacII*, хорошо совпали со значениями, рассчитанными для последова-

Сравнение расчетных и экспериментальных данных о характере расщепления ДНК фага  $\lambda$  рестриктазой *Eco72I* и некоторыми другими рестриктазами \*

№ фрагмента	<i>Eco72I</i>		<i>Eco72I</i> + <i>SmaI</i>		<i>Eco72I</i> + <i>BamHI</i>		<i>Eco72I</i> + <i>HindIII</i>		<i>Eco72I</i> + <i>SacII</i>	
	Р	Э	Р	Э	Р	Э	Р	Э	Р	Э
1	26 525	26 422 **	19 397	19 500	16 841	16 500	23 131	23 100	20 320	20 000
2	14 956	15 000	8 271	8 200	6 902	6 800	9 419	9 400	13 861	14 000
3	6 141	6 200	7 128	7 000	6 527	6 500	4 359	4 360	6 141	6 200
4	880	880	6 141	6 200	6 141	6 200	3 897	3 800	4 919	4 800
5			5 092	5 000	5 505	5 500	2 023	2 020	1 095	1 100
6			1 593	1 550	4 179	4 200	1 782	1 800	1 076	1 100
7			880	880	1 447	1 400	1 371	1 350	880	880
8					629	620	951	940	210	—
9					251	—	880	880		
10							564	560		
11							125	—		

\* Расчетные (Р) и экспериментально найденные (Э) величины фрагментов даны в парах оснований.

\*\* Величина фрагмента получена вычитанием суммы длины остальных фрагментов из известной общей длины молекулы ДНК.

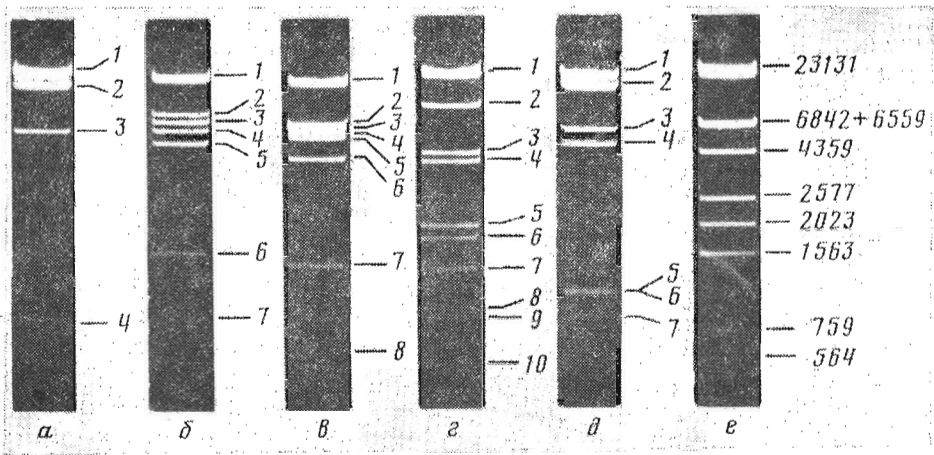


Рис. 1

Рис. 1. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК фага  $\lambda$ , полученных действием рестриктазы *Eco72I* отдельно и совместно с некоторыми известными рестриктазами. Электрофорез проводили в блоке 0,7% агарозы. *a* — *Eco72I*, *b* — *Eco72I* + *SmaI*, *c* — *Eco72I* + *BamHI*, *d* — *Eco72I* + *HindIII*, *e* — стандартная смесь фрагментов (смесь фрагментов ДНК фага  $\lambda$ , полученных при действии рестриктаз *HindIII* и *Eco81I* — изоизомера рестриктазы *SauI*; величины фрагментов указаны в парах оснований). Величины фрагментов, разделенных в дорожках *a* — *d*, приведены в таблице

Рис. 2. Определение места расщепления декануклеотида  $^{32}P$ GGCACGTGCC рестриктазой *Eco72I*: *a* — частичный 3'-экзонуклеазный гидролиз фосфодиэстеразой змеиного яда, *b* — гидролиз рестриктазой *Eco72I*, ХС — краситель ксиленцианол

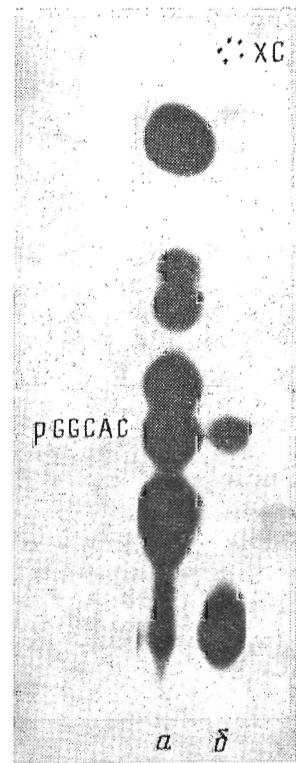
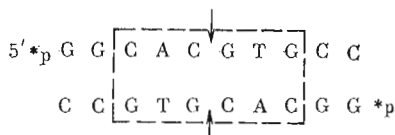


Рис. 2

тельности dCACGTG на основе известной первичной структуры ДНК фага  $\lambda$  [11] (рис. 1, таблица).

Для подтверждения последовательности dCACGTG в качестве субстрата рестриктазы *Eco72I*, а также для определения места расщепления узнаваемой последовательности был использован синтетический самокомплементарный декануклеотид dGGCACGTGCC, содержащий предполагаемый сайт. После введения 5'- $^{32}P$ -концевой метки двуспиральный субстрат обрабатывали рестриктазой *Eco72I* и продукты реакции анализировали гомохроматографией [12] (рис. 2). Единственным меченым продуктом расщепления дуплекса оказался пентануклеотид d $^{32}P$ GGCAC.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемая рестриктаза расщепляет субстрат в центре узнаваемой последовательности с образованием тупых концов:



Таким образом, *Eco72I* обладает уникальной субстратной специфичностью и пополняет список известных рестриктаз.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Yoshimori R. Ph. D. Thesis. University of California. San Francisco, 1971.
2. Холмина Г. В., Ребеншиш Б. А., Скоблов Ю. С., Миронов А. А., Янковский Н. К., Козлов Ю. И., Глатман Л. И., Мороз А. Ф., Дебабов В. Г. Докл. АН СССР, 1980, т. 253, № 2, с. 495—497.
3. Александрова С. С., Карамов Э. В., Никольская И. И., Тихоненко Т. И., Дебов С. С. Докл. АН СССР, 1978, т. 243, № 1, с. 234—236.
4. Худяков Ю. Е., Лопарева Е. Н., Смирнов В. Д., Никольская И. И., Сурин В. Л., Боровик А. С., Дебов С. С. Вopr. мед. химии, 1983, т. 29, вып. 3, с. 22—25.
5. Mise K., Nakajima K. Gene, 1984, v. 30, № 1, p. 79—85.
6. Janulaitis A., Petrušyte M., Butkus V. FEBS Lett., 1983, v. 161, № 1, p. 213—216.
7. Янулайтис А. А., Стакенис П. С., Пятрушите М. П., Битинайте Ю. Б., Климаншаускас С. Й., Буткус В. В. Молекулярн. биология, 1984, т. 18, № 1, с. 115—129.
8. Буткус В. В., Пятрушите М. П., Янулайтис А. А. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 7, с. 987—988.
9. Буткус В., Казлаускене Р., Гилвонаускайте Т., Пятрушите М., Янулайтис А. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 11, с. 1572—1573.
10. Fuchs C., Rosenfold E. C., Honigman A., Szybalski W. Gene, 1980, v. 10, № 4, p. 357—370.
11. Sanger F., Coulson A. R., Hong G. F., Hill D. F., Petersen G. B. J. Mol. Biol., 1982, v. 162, № 4, p. 729—773.
12. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. Nucl. Acids Res., 1974, v. 1, № 3, p. 331—353.

Поступило в редакцию  
20.XII.1985

#### A NEW SPECIFIC ENDODEOXYRIBONUCLEASE FROM *ESCHERICHIA COLI* PFL 72

KAZLAUSKIENĖ R., MANELIENĖ Z., BUTKUS V., PETRUŠYTĖ M., JANULAITIS A.

ESP «Fermentas», Vilnius

A restriction endonuclease *Eco72I* with a novel substrate specificity has been isolated from *Escherichia coli* strain RFL 72. The enzyme recognizes  $5' \text{CACGTG} 3'$  hexanucleotide palindromic sequence and cleaves it, as indicated by the arrows, to produce blunt-ended fragments.